

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-029097

(43)Date of publication of application : 06.02.2001

(51)Int.Cl.

C12Q 1/26
A23L 1/10

(21)Application number : 11-207819

(71)Applicant : SAPPORO BREWERIES LTD

(22)Date of filing : 22.07.1999

(72)Inventor : KURODA HISAO

(54) MEASUREMENT OF LIPOXYGENASE ACTIVITY IN GRAIN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To conveniently and quickly measure lipoxygenase activity in grains e.g. for beer-brewing raw material which participates in oxidation reaction of lipid by reacting a grain extract with a substrate solution and then adding FOX(Ferrous oxidation/xylenol orange method) reagent to the reaction product, followed by measuring absorbance.

SOLUTION: When reacting a grain extract e.g. comprising an extract of barley or malt with a substrate solution containing a free fatty acid (or its ester) such as linoleic acid or phosphatidylcholine dilinoleyl, dilinolein or trilinolein as a substrate, by terminating the reaction through the addition of an organic solvent such as methanol dissolving the free fatty acid or an organic solvent such as 1-butanol extracting neutral fat, or the like, recovering a fraction containing the reaction product, adding FOX reagent to the fraction and by measuring absorbance, lipoxygenase activity in grain which participates in oxidation reaction of lipid is measured conveniently in a short time.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

08.03.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-29097

(P 2 0 0 1 - 2 9 0 9 7 A)

(43)公開日 平成13年2月6日(2001.2.6)

(51)Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テマート (参考)
C 1 2 Q 1/26		C 1 2 Q 1/26	4B023
A 2 3 L 1/10		A 2 3 L 1/10	A 4B063

審査請求 未請求 請求項の数5 OL (全 5 頁)

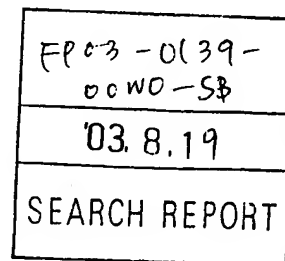
(21)出願番号	特願平11-207819	(71)出願人	000002196 サッポロビール株式会社 東京都渋谷区恵比寿四丁目20番1号
(22)出願日	平成11年7月22日(1999.7.22)	(72)発明者	黒田 久夫 静岡県焼津市岡当目10 サッポロビール株 式会社醸造技術研究所内
		(74)代理人	100074077 弁理士 久保田 藤郎 (外1名) Fターム (参考) 4B023 LG05 LK04 LP20 4B063 QA01 QQ16 QQ22 QR45 QR47 QR50 QR57 QS13 QX01

(54)【発明の名称】 穀類中のリポキシゲナーゼ活性の測定方法

(57)【要約】

【課題】 穀類粗抽出液や仕込もろみ中のLOX活性をより簡便な方法で、しかも短時間で多検体の測定が可能な方法を提供すること。

【解決手段】 穀類抽出液と基質溶液とを反応させたのち、反応生成物にFOX試薬を加えて吸光度を測定することを特徴とする穀類中のリポキシゲナーゼ活性の測定方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 穀類抽出液と基質溶液とを反応させたのち、反応生成物にFOX試薬を加えて吸光度を測定することを特徴とする穀類中のリポキシゲナーゼ活性の測定方法。

【請求項2】 穀類抽出液と基質溶液とを反応させ、該反応を遊離脂肪酸を溶解するメタノール等の有機溶媒または中性脂肪等を抽出する1-ブタノール等の有機溶媒を添加して停止させたのち、反応生成物を含む画分を回収し、これにFOX試薬を加えて吸光度を測定することを特徴とする穀類中のリポキシゲナーゼ活性の測定方法。

【請求項3】 基質溶液が、基質として遊離脂肪酸または脂肪酸エステルを含む溶液である請求項1または2記載の測定方法。

【請求項4】 基質溶液が、基質としてリノール酸、ホスファチジルコリン、ジリノレイル、ジリノレインまたはトリリノレインのいずれかを含む溶液である請求項1または2記載の測定方法。

【請求項5】 穀類抽出液が、大麦または麦芽の抽出液である請求項1または2記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、穀類中のリポキシゲナーゼ活性の測定方法に関し、詳しくはビール醸造の原料などとして用いられる穀類中に存在し、脂質の酸化反応に関与するリポキシゲナーゼ活性の測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】リポキシゲナーゼは、不飽和脂肪酸の二重結合に酸素を添加して過酸化物を生ずる酸化還元酵素としてよく知られており、多くの分野でその活性の度合いを測定する有効な方法が研究されている。例えば、植物の分野では、リポキシゲナーゼは特に大豆、大麦等の穀類に多く含まれている。ビールの原料であるビール大麦については、麦芽製造工程やビール醸造上の仕込工程において、ビールの品質に重要な影響を与える脂質酸化が起こるが、これはリポキシゲナーゼ（以下、LOXと称する。）が原因であることが知られている。LOXの働きにより、脂質は脂質ヒドロペルオキシドに変化し、これらが泡持ち阻害活性を有するトリヒドロキシオクタデセン酸（藪内精三、醸造協会誌、75、273、1980）や老化臭の原因物質と考えられるトランス-2-ノネナールの前駆体物質であると言われている。

【0003】発芽大麦や麦芽中の脂質に占める各種脂質の割合は、遊離脂肪酸が数%、中性脂肪が約70%、リン脂質が約30%であり、これら脂質の酸化はビールの品質に影響を与える重要なことであるにもかかわらず、これまでのLOX研究は遊離脂肪酸を基質としたものが大半で、脂肪酸エステルを基質とした研究は殆ど行われ

ていなかった。その理由として、脂質を基質とした場合の簡便なLOX活性測定法が開発されていなかったことが挙げられる。例えば、リノール酸を基質としてリノール酸ヒドロペルオキシドの生成を紫外外部吸収によって測定する方法（Baxter; j. Inst. Brew., 88, 390-396, 1982）では、基質はリノール酸に限定される。また、酵素センサーを用いて酵素消費をモニターする方法は、感度が低いために、多量の脂質が基質として必要であるが、脂肪酸エステルは非常に高価であるため、現実には使用できない。

【0004】さらに、従来法では、多検体を同時処理することが難しく、LOXが低い植物品種や熱安定性、pH安定性等が低い植物品種をスクリーニングすることができなかった。大豆では、酵素標識抗体を利用したリポキシゲナーゼ検出法が提案されている（Evans et al.; Crop. Sci., 34, 1529-1537, 1994）。しかし、この方法は酵素を検出する方法であって、該酵素の活性を測定することはできない。また、この方法は抗原特異性の異なるLOXは検出できない等の欠点がある。

【0005】一方、Piazzaらは、精製大豆リポキシゲナーゼを材料として、FOX法（Ferrous oxidation/xylenol orange method）による脂肪酸エステルの酸化活性測定法を報告している（JAACS, 72(4), 463-466, 1995）。FOX法とは、脂質ヒドロペルオキシドが二価鉄を三価鉄に酸化することを利用し、三価鉄とキシレノールオレンジ複合体を吸光度（波長540nmの可視光の吸光度）を用いて定量することにより、間接的に資料中の脂質ヒドロキシペルオキシドを定量する方法である。彼らは、該酵素と基質を一定時間反応させた後、クロロホルム・メタノール抽出し、生成したヒドロペルオキシドを分離し、クロロホルム層を窒素を吹き付けて乾燥し、再度メタノールに溶解し、FOX法に使用される試薬（以下、FOX試薬という。）と反応させてLOX活性を測定している。このため、この方法では、乾燥・溶解に時間がかかり、多検体を処理するには適さない等の多くの問題を抱えている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明の目的は、上記の問題を解決し、穀類粗抽出液、特に大麦または麦芽より抽出した抽出液のLOX活性をより簡便な方法で、しかも短時間で測定することのできるLOX活性の測定方法を提供することである。本発明者らは、係る課題を解決すべく検討を重ね、FOX法を利用したLOXの活性測定方法を開発し、本発明を完成した。

【0007】

【課題を解決するための手段】請求項1記載の本発明は、穀類抽出液と基質溶液とを反応させたのち、反応生成物にFOX試薬を加えて吸光度を測定することを特徴とする穀類中のリポキシゲナーゼ活性の測定方法である。請求項2記載の本発明は、穀類抽出液と基質溶液と

を反応させ、該反応を遊離脂肪酸を溶解するメタノール等の有機溶媒または中性脂肪等を抽出する1-ブタノール等の有機溶媒を添加して停止させたのち、反応生成物を含む画分を回収し、これにFOX試薬を加えて吸光度を測定することを特徴とする穀類中のリポキシゲナーゼ活性の測定方法である。請求項3記載の本発明は、基質溶液が、基質として遊離脂肪酸または脂肪酸エステルを含む溶液である請求項1または2記載の測定方法。請求項4記載の本発明は、基質溶液が、基質としてリノール酸、ホスファチジルコリンジリノレイル、ジリノレインまたはトリリノレインのいずれかを含む溶液である請求項1または2記載の測定方法である。請求項5記載の本発明は、穀類抽出液が、大麦または麦芽の抽出液である請求項1または2記載の測定方法である。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明は、穀類中のLOX活性の測定方法に関するものであり、この方法は、穀類の種子や発芽種子あるいは穀類加工品を適当な緩衝液を用いて抽出したものに、基質として脂肪酸もしくは脂肪酸エステルを含む溶液を加えて反応させた後、反応生成物にFOX試薬を加えて吸光度を測定するものである。詳しくは、穀類抽出液と基質溶液を所定時間反応させたのち、メタノールまたは1-ブタノールを添加して反応を停止させ、反応生成物である脂質ヒドロペルオキシドを含む画分を分離し、FOX試薬と混合して吸光度を測定する。

【0009】本発明において穀類としては、大麦が好適であり、その種子や発芽種子またはそれらの加工品が対象とされ、具体的には大麦の麦芽や緑麦芽等が挙げられる。また、基質としては、遊離脂肪酸や中性脂質または極性脂質等の脂肪酸エステルを用いることができ、中でもリノール酸、ホスファチジルコリンジリノレイル、ジリノレインおよびトリリノレインが好ましい。次に、FOX試薬とは、キシレノールオレンジ、硫酸アンモニウム鉄(II)6水和物、硫酸および2,6-ジ-*t*-ブチル-*p*-クレゾールをメタノールに溶解して調製したもので、例えばキシレノールオレンジ7.2mg、硫酸アンモニウム鉄(II)6水和物9.8mg、硫酸69μLおよび2,6-ジ-*t*-ブチル-*p*-クレゾール88mgを90%メタノール100mLに溶解することにより調製された試薬である。

【0010】以下に、本発明のLOX活性の測定方法について説明する。まず、原料の穀類をモルトミル等の粉砕機で粉砕し、得られた粉砕物に緩衝液を加え、0~50℃の温度、好ましくは室温(20℃)で5~60分間、好ましくは10分間攪拌して抽出する。次いで、攪拌物を急冷したのち、適当な手段により濾過して抽出液を得る。必要に応じて、この抽出液を遠心分離などの固-液分離を行い、得られた上清を再び濾過する。

【0011】このようにして得た穀類抽出液に基質溶液

を加えて反応させる。このとき、基質は界面活性剤、乳化剤、緩衝液などと混和して用いる。一定時間反応させた後、反応を停止する。反応停止は、基質としてリノール酸やホスファチジルコリンジリノレイルのような遊離脂肪酸や極性脂肪酸エステルを使用した場合は、メタノールを用いて行い、ジリノレインやトリリノレインのような中性脂質を基質として用いた場合は、1-ブタノールを添加して反応を停止させる。その後、反応物から反応生成物である脂質ヒドロペルオキシド含有画分を分離する。具体的には、遠心分離法、その他の固-液分離法により固体と液体を分離し、遊離脂肪酸や極性脂肪酸エステルを基質として用いた場合は、上清画分を回収する。一方、中性脂質を基質として用いた場合は、反応停止剤である1-ブタノール画分を回収する。

【0012】次いで、脂質ヒドロペルオキシド含有画分にFOX試薬を加えて混合し、室温で30~90分間、好ましくは30分間放置する。その後、540nmにおける吸光度を測定する。得られた測定値を予め作成した検量線と照合してLOX活性を求める。検量線の作成は、クメンヒドロペルオキシドを適当な緩衝液で希釈して調製した標準クメンヒドロペルオキシド溶液をFOX試薬と混合し、この混合物を上記と同様にして吸光度を測定することによって行う。

【0013】

【実施例】次に、実施例により本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

2種類の大麦A、Bの製麦過程の大麦(成熟種子)、緑麦芽(発芽1,6日目)、焙燥麦芽(焙燥1,2,3,12時間)および麦芽を凍結乾燥したもの各20gを、EBCモルトミルで粉砕し、得られた粉砕物1gに対して10mLの酢酸緩衝液(pH5.0)を加え、室温で10分間攪拌した。攪拌後、氷浴上で0℃まで急冷し、濾布を用いて濾過した。このようにして得た穀類抽出液を4℃で15分間、遠心分離(3000rpm)し、得られた上清を0.45μmのフィルターで濾過した。

【0014】続いて、氷浴上で該抽出液500μLを0.8mm厚のガラス試験管にとり、これに67μLの0.1Mデオキシコール酸ナトリウムと1Mトリス緩衝液(pH8.0)を加えた。次に、25℃に設定したインキュベーター内で10秒間保温後、40mMの基質溶液を終濃度2mMとなるように加えて、酸化反応を開始した。なお、基質として、リノール酸(LH)、ホスファチジルコリンジリノレイル(PC)、ジリノレイン、トリリノレインの4種類を用いた。このうち、リノール酸を用いた場合には、リノール酸1gを秤量し、これに40mMとなるように1% Tween 20を加えて攪拌し、エマルジョンを形成させたものを該基質溶液として使用した。また、基質としてホスファチジルコリンジリノレイル、ジリノレイン、トリリノレインを用いた場合

には、それぞれ40mgを秤量し、これに40mMとなるように1%デオキシコール酸ナトリウムと1Mトリス緩衝液(pH8.0)を加えて攪拌し、エマルジョンを形成させたものを基質溶液として使用した。

【0015】反応を開始してから30分経過したのち、反応を停止した。反応停止は、基質としてリノール酸またはホスファチジルコリンを用いた場合は、100%メタノールを668 μ L加えることにより行い、氷浴上で20分間静置した。その後、反応物を4℃で15分間、遠心分離(3000rpm)して上清を回収し、これをサンプルとして用いた。また、基質としてジリノレインまたはトリリノレインを用いた場合は、668 μ Lの1-ブタノールを添加して反応を停止させた後に、668 μ Lのクロロホルムを加えて激しく攪拌し、次いで4℃で15分間、遠心分離(3000rpm)を行って1-ブタノール画分を回収し、これをサンプルとして用いた。

【0016】このようにして得た各サンプル20 μ Lを、マイクロタイタープレートに移した後、FOX試薬を200 μ L添加し、室温で30分間放置した。その後、540nmにおける吸光度を、プレートリーダー(バイオラッド社製)で測定した。なお、FOX試薬は、キシレノールオレンジ7.2mg、硫酸アンモニウム鉄(II)6水和物9.8mg、硫酸69 μ Lおよび2,6-ジ-tert-ブチルpクレゾール8.8mgを、90%メタノール100mLに溶解することにより、測定時に随時調製した。また、標準クメンヒドロペルオキシド溶液は、クメンヒドロペルオキシド50mgをメタノールで10mMとなるように溶解し、これを上記酵素抽出液で0.1mMから1mMとなるように希釈して調製した。予め、これを用いて、上記と同様にして540nmにおける吸光度を測定し、検量線を作成した。各サンプル中の脂質ヒドロペルオキシド量は、前記の測定値を検量線と照合することによって求め、LOX活性を算出した。

【0017】基質としてリノール酸(LH)またはホスファチジルコリンジリノレイル(PC)を使用したときの結果を図示した。図1は大麦A、図2は大麦Bのそれぞれの製麦過程における脂質ヒドロペルオキシドの生成量の経時的変化を示す。なお、ジリノレイン、トリリノレインを基質として使用した場合も、同様の傾向が認められた。

【0018】この結果、発芽前的大麦にはLH酸化活性のみ存在することが明らかとなった。さらに、発芽後、LH酸化活性に加えてPC酸化活性も誘導されることが分かった。また、本発明によるLOX活性の測定時間は、従来の方法と比べて、大幅に短縮された。Piazzaの方法では、反応生成物であるヒドロペルオキシドの抽出のためにクロロホルム層の分離(1~2分)と窒素を吹き付けることによる乾燥(3~6分)と、再度メタノール

に溶解する操作(1~2分)が必要であるが、これは1検体当たり最低5~10分を要する。本発明によれば、この操作を省略することができ、たとえば100検体を処理するのに約8~16時間短縮できる。

【0019】実施例2

EBCディスクミルで粉碎した麦芽3.53gに、50℃に加温しておいた水道水10mLを加え、50℃のインキュベーター上で30秒間攪拌した。攪拌後に氷浴上で4℃となるまで急冷し、濾布を用いて濾過した。次いで、濾過液を4℃で15分間、遠心分離(3000rpm)し、得られた上清を0.45 μ mのフィルターで濾過し、穀類抽出液を得た。

【0020】続いて、実施例1と同様に反応液を調製した。基質としてリノール酸を用い、反応温度0℃、25℃、50℃におけるリノール酸ヒドロペルオキシド生成量を実施例1と同様の方法により定量した。また、50℃で20分間の熱処理による酵素失活を試験した。抽出液を50℃で20分間処理した後、同様に25℃のリノール酸ヒドロペルオキシド生成量を実施例1と同様の方法で定量した。

【0021】結果を図3、4に示した。図3は、麦芽を原料とし、酵素反応の温度条件を変化させた場合のリノール酸ヒドロペルオキシド生成量の経時的な変化を示したものである。また、図4は、50℃で20分間の熱処理を行った場合のリノール酸ヒドロペルオキシド生成量の経時的な変化を示したものである。

【0022】図3から明らかなように、0℃と25℃で酵素反応を行ったときは、反応時間に比例してリノール酸ヒドロペルオキシドの生成量が増加した。これに対して、50℃で酵素反応を行ったときは、反応時間の経過とともにリノール酸ヒドロペルオキシドの生成量が徐々に低下する傾向を示した。また、初期の酵素活性(反応速度)は50℃、25℃、0℃の順に高いことが明らかとなった。さらに、0℃と25℃で酵素反応を行ったときは、反応開始40分後にはリノール酸ヒドロペルオキシドは、ほぼ同じレベルに達することが明らかとなった。

【0023】また、図4から明らかなように、50℃で20分間の熱処理を行っても、熱処理をしていないものと同様に、リノール酸ヒドロペルオキシドの生成量が反応時間に比例して増加することが明らかとなり、麦芽LOXは50℃、20分間の熱処理では殆ど失活しないことが分かった。

【0024】

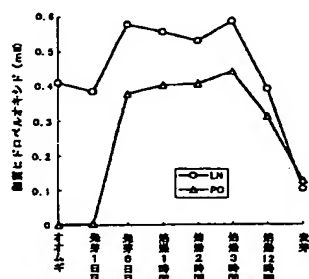
【発明の効果】本発明の測定方法によれば、原料穀類の品質、麦芽品質やビール品質に重要な影響を与える酵素リボキシゲナーゼの活性測定を従来法に比べて簡便、かつ短時間に行うことができる。また、本発明は酵素リボキシゲナーゼを欠失する品種のスクリーニングに応用することができる。

【図面の簡単な説明】

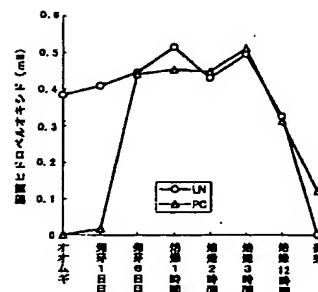
【図1】 基質としてリノール酸またはホスファチジルコリンを用いたときの大麦Aの製麦過程におけるヒドロペルオキシド生成量の経時的変化を示した図である。

【図2】 基質としてリノール酸またはホスファチジルコリンを用いたときの大麦Bの製麦過程におけるヒドロペルオキシド生成量の経時的変化を示した図である。

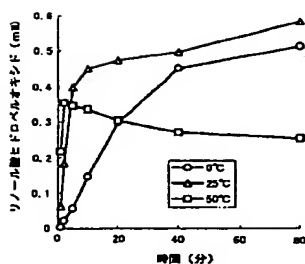
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

